

青藤碱抑制人宫颈癌的研究

张瑜 吴敏 李新国

(中南大学湘雅医院妇产科 湖南长沙 410008)

摘要 目的:研究青藤碱(Sinomenine, SIN)对宫颈癌Hela细胞增殖的影响及其机制,为SIN在宫颈癌的预防和治疗上提供实验依据。方法:不同浓度SIN分别处理体外培养的人宫颈癌细胞系Hela细胞后,采用噻唑蓝(MTT)法检测处理24h、48h、72h后Hela细胞的增殖活性,流式细胞仪测定细胞周期和细胞凋亡。结果:1. 0.1、0.2、0.4、0.625、1.25、2.5mmol/L SIN处理Hela细胞24h、48h、72h后,细胞增殖明显受到抑制,呈时间和剂量依赖性特点;2.流式细胞仪细胞周期分析表明,SIN处理组G1期细胞比例明显增加,S期细胞比例明显减少,两组比较有统计学意义;3.细胞凋亡分析表明,SIN处理组细胞凋亡率较对照组升高,呈时间和剂量依赖性特点;结论:SIN在体外能有效抑制宫颈癌细胞生长,其机制可能与其阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡有关,SIN有望应用于宫颈癌的辅助治疗。

关键词: 宫颈癌;青藤碱;细胞凋亡

中图分类号: R737.3 **文献标识码:** A

Experimental study on the effect of selective COX-2 inhibitor sinomenine on Hela cells

ZHANG Yu, WU Min, LI Xin-guo

(Department of Obstetric and Gynecology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan, China)

ABSTRACT Objective: To study the inhibitory effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor Sinomenine(SIN) on Hela cells and further investigate the mechanism by which Sinomenine inhibited proliferation of Hela cells, and to afford laboratory data for application of SIN in the prevention and treatment for cervical cancer. **Methods:** Hela cells were treated with various concentration of SIN for 24, 48 and 72h, the cell proliferation was estimated using the MTT assay, and the cell cycle distribution and apoptosis were examined by Flow cytometry. **Results:** SIN inhibits proliferation of Hela cells in a dose and time-dependent manner. Flow cytometry results demonstrated that the cell cycle was redistributed: the G1-Phase cell fraction was increased, while the S-Phase cell fraction was significantly decreased after the cells were treated with SIN ($p < 0.05$); SIN could induce apoptosis of Hela cells in a dose and time-dependent manner. **Conclusion:** SIN could inhibit the growth of Hela cells, the mechanism may relate to its blockage of cell cycle and apoptosis induction.

Key Words: Cervical carcinoma; Sinomenine; Apoptosis

青藤碱(sinomenine, SIN)是从中药青风藤中提取的生物碱单体,其盐酸盐多为药用。青藤碱具有抗炎、免疫抑制、镇痛、降压、抗心律失常等药理作用,已有正清风痛宁片、盐酸青藤碱注射液、毛青藤总碱片等制剂应用于临床,治疗类风湿性关节炎等各种风湿病以及心律失常取得较好疗效。SIN制剂已经广泛应用于风湿等疾病的治疗。为降低其副作用,现已研制出了SIN的凝胶剂,它具有绕过肝脏的首过效应、避免胃肠道的破坏、降低药物毒副作用、给药方便等优点^[1]。研究报道SIN对环氧合酶-2(cyclooxygenase, COX-2)的抑制作用较强^[2,3],而多数研究报道COX-2在正常宫颈组织中不表达,而在宫颈癌组织中呈阳性表达^[4,5]。因此,研究COX-2抑制剂对宫颈癌细胞生长的影响将为临床宫颈癌的治疗提供新的思路。

1 材料及方法

1.1 主要试剂

作者简介:张瑜,(1972-),女,博士,主治医师

主要研究方向:妇科肿瘤学

通讯作者:李新国,Email:cszhangyu@126.com

(收稿日期:2006-05-21 接受日期:2006-06-15)

SIN为正清风痛宁注射液(75mmol/L,湖南正清药业有限公司赠送)。MIT为SIGMA公司产品(美国),RPMI1640、胰酶、EDTA、DMSO均为GIBCO产品(美国),小牛血清购自杭州四季青公司。

1.2 细胞系

宫颈癌细胞株Hela细胞由中南大学湘雅医院细胞生物研究室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养: Hela细胞置于37℃,饱和湿度,含5%CO₂的孵箱中培养,培养液RPMI1640含10%小牛血清,100U/mL青霉素和100U/mL链霉素。根据细胞生长状态每2~3天传代一次。当细胞生长状态稳定,呈对数生长期,用于实验。SIN用RPMI1640培养液稀释,现配现用。

1.3.2 MTT实验:将对数生长期Hela细胞按 3.6×10^3 个细胞/孔密度接种于96孔板培养,24小时后吸出原培养液,SIN处理组加入含SIN浓度分别为0.1、0.2、0.4、0.625、1.25、2.5mmol/L的RPMI1640培养液200 μ L,设培养液中不加药物只含RPMI1640培养液的为对照组,另设空白对照。每组设4个复孔。继续培养24、48、72小时后,进行MTT实验,每孔加入MTT溶液(5mg/mL)20 μ L,继续培养4小时,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入DMSO 150 μ L,振荡10分钟,使结晶充

分溶解,用酶标仪在 490nm 处测定各孔的吸光度 A 值(A490),参考波长为 630nm,按下列公式计算细胞生长抑制率:

$$\text{细胞生长抑制率}(R) = \frac{1 - A_{490} \text{ 实验组}}{A_{490} \text{ 对照组}} \times 100\%$$

1.3.3 相差显微镜观察细胞形态及数目改变:将各处理组及各时间点状态下的细胞,在相差显微镜下观察细胞形态及细胞数目的改变。

1.3.4 检测细胞周期和细胞凋亡:将 HeLa 分成 SIN 处理组与对照组按下列方法进行实验。SIN 处理组加入含 SIN 浓度分别为 0.625、1.25、2.5mmol/L 的 RPMI 1640 培养液,对照组加培养基,分别培养 24、48 和 72 小时后收集各组细胞,制成 1 × 10⁵/mL 细胞悬液,用 PBS 液洗两遍,加入预冷的 70% 乙醇固定,4℃ 保存待测。测定前用 PBS 洗去乙醇,加入 PI 染液,避光染色 30 分钟后,流式细胞仪上进行细胞周期和细胞凋亡分析,得出细胞各周期的百分率及凋亡指数。

1.4 统计学处理

所有数据均以均数 ± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示。以 SPSS 10.0 版专用统计分析程序对各组数据进行单因素方差分析。

2 实验结果

2.1 SIN 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的影响:

不同浓度 SIN 作用人宫颈癌 HeLa 细胞后,随着时间的延长和浓度的增加,SIN 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用也随之增

强(见图 1)。

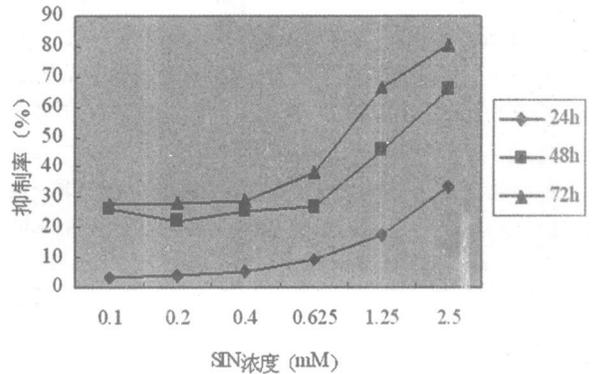


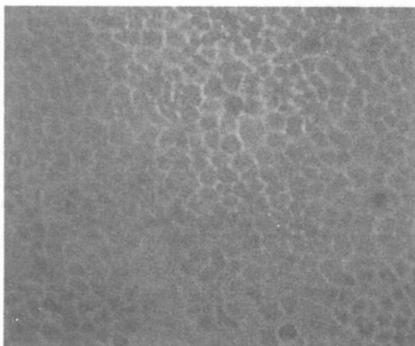
图1 SIN 对宫颈癌 HeLa 细胞增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of SIN on the cervical cancer cell HeLa proliferation

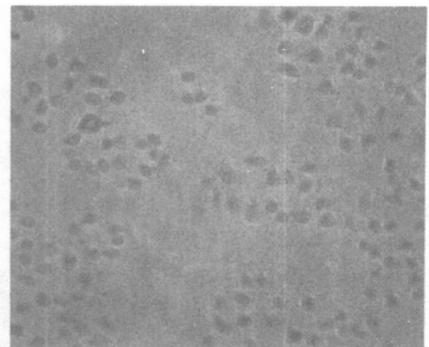
2.2 SIN 对人宫颈癌 HeLa 细胞形态学的影响

0.2mmol/L SIN 作用人宫颈癌 HeLa 细胞 72 小时后,细胞数目明显减少,同时细胞形态发生变化,细胞从多边形变成圆形,呈凋亡细胞改变(见图 2)。

2.5mmol/L SIN 作用 HeLa 细胞 24 小时后,流式细胞仪检测发现,SIN 处理组凋亡指数为 9.76 ± 0.02%,对照组凋亡指数为 3.61 ± 0.03%。两组比较有统计学意义。(P= 0.008)见图 3。



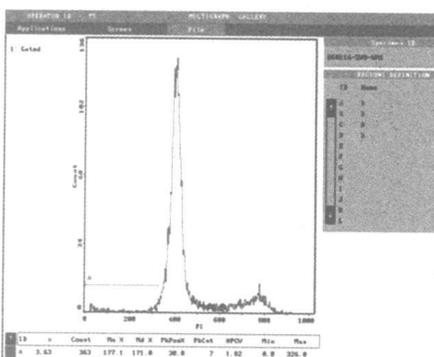
对照组 (Control group)



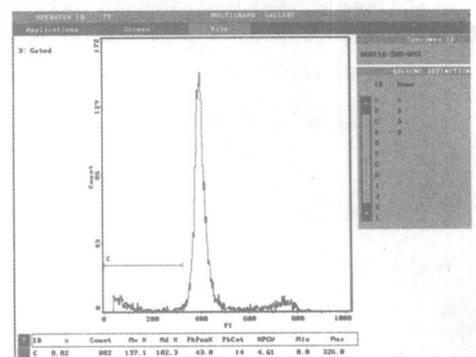
SIN 组 (SIN group)

图 2 SIN 作用人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞 72 小时相差显微镜下观察结果(× 200)

Fig. 2 The result of the effect of SIN on the cervical cancer cell HeLa after 72h under phasecontrast microscope (× 200)



对照组 (Control group)



SIN 组 (SIN group)

图 3 SIN 作用于人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞 72 小时细胞凋亡指数变化

Fig. 3 Discussion on the index change of cell apoptosis when effected by SIN after 72h

2.3 SIN 对宫颈癌细胞 HeLa 细胞周期及凋亡率的影响

流式细胞仪细胞周期分析表明,在不同浓度 SIN 干预 HeLa 细胞 24、48 小时后, SIN 处理组较对照组 G1 期细胞比例明显增加, S 期细胞比例明显减少,且随着 SIN 剂量的增加, G1 期细胞比例上升更明显, S 期细胞比例下降更明显。见表 1。随 SIN 浓度增加及作用时间延长, HeLa 细胞凋亡率呈递增趋势。见表 2。

表 1 各浓度、时间点 SIN 作用人宫颈癌细胞的细胞周期分析

Tab. 1 Analysis of the cervical cancer cell cycle effected by SIN with different concentration and time

分组	细胞周期(%)					
	作用 24h		作用 48h		作用 72h	
	G1	S	G1	S	G1	S
对照组	68.1	19.6	76.0	15.7	53.8	36.5
SIN(2.5mmol/L)	83.5	13.2	90.2	6.2	72.6	21.2
SIN(1.25mmol/L)	82.8	12.5	86.9	9.1	67.3	26.8
SIN(0.625mmol/L)	75.9	17.2	86.6	9.0	53.6	36.9

表 2 不同浓度及时间点 SIN 作用人宫颈癌细胞的细胞凋亡分析

Tab. 2 Analysis of the cervical cancer cell apoptosis effected by SIN with different concentration and time

分组	凋亡率(%)		
	24 小时	48 小时	72 小时
对照组	1.4	22.3	58.6
SIN(2.5mmol/L)	9.6	48.2	72.6
SIN(1.25mmol/L)	6.8	42.6	69.4
SIN(0.625mmol/L)	5.6	38.4	66.8

3 讨论

多数研究报道 COX-2 在正常宫颈组织中不表达,而在宫颈癌组织中呈阳性表达^[4,5]。Dai Y^[6]等则报道 COX-2 可能通过提高前列腺素(PGs)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达从而在宫颈癌早期癌变中发挥作用。Kim、Ferrandina G 等^[7,8]均报道 COX-2 表达阳性是导致治疗效果不佳和预后不良的因素之一。越来越多的文献报道抑制 COX-2 的活性,能抑制肿瘤细胞的增殖。SIN 虽然主要用于风湿的治疗,但有研究报道 SIN 对 COX-2 的表达具有较强的选择性抑制作用;陈炜^[2]等报道 SIN 对脂多糖诱导的前列腺 PC-12 细胞的 COX-2 mRNA 及蛋白表达具有不同程度的抑制作用,对 PGE₂ 的合成有明显的抑制作用,且抑制效应与 SIN 浓度呈正相关。本研究发现, SIN 对宫颈癌细胞的增殖具有明显的抑制作用,并呈

时间和剂量依赖性特点,与以上研究报道一致。而本研究从细胞周期和凋亡的角度分析了 SIN 对宫颈癌细胞增殖的抑制作用,发现 SIN 可能是通过改变细胞周期分布,使 HeLa 细胞阻滞于 G1 期,同时促进细胞凋亡来实现对 HeLa 细胞增殖的抑制。这一结果为 SIN 应用于宫颈癌临床治疗提供了一定的实验依据。

4 结论

研究结果表明:①HeLa 细胞随时间及剂量的不同,呈时间和剂量依赖性特点。时间越长,抑制效果越明显;剂量大的组,抑制率也较大;②SIN 可以使 G1 期细胞比例明显增加, S 期细胞比例明显减少; SIN 可能是通过改变细胞周期分布,使 HeLa 细胞阻滞于 G1 期;③SIN 浓度增加及作用时间延长, HeLa 细胞凋亡率呈递增趋势; SIN 可能促进细胞凋亡来实现对 HeLa 细胞增殖的抑制。

总体来讲 SIN 在体外能有效抑制宫颈癌细胞生长,其机制可能与其阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡有关。由于宫颈具有局部给药方便的特点,有望开发研制出适合局部治疗的 SIN 剂型,应用于宫颈癌的辅助治疗。

参考文献

- [1] 易丹丹,蔡鸿生,罗顺德,等.青藤碱凝胶对大鼠佐剂性关节炎的治疗作用[J].中国医院药学杂志,2002,22(8):465
- [2] 王文君,王培训,李晓娟.青藤碱抗炎机理——青藤碱对外周血单个核细胞环氧化酶活性及其基因表达的影响[J].中国中药杂志,2003,28(4):352
- [3] 陈炜,沈悦娣,赵光树,等.青藤碱对脂多糖诱导的神经细胞环氧化酶-2 表达的影响[J].中国中药杂志,2004,29(9):900-903
- [4] Nagai N, Tian X, Mukai K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 protein and its relationship to apoptosis in cervical carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy[J]. Int J Med, 2003, 12(5):709-714
- [5] Kulkarni S, Rader J S, Zhang F, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. Clin Cancer Res[J]. 2001, 7(2):429-434
- [6] Dai Y, Zhang X, Peng Y, et al. The expression of cyclooxygenase-2, VEGF and PGs in CIN and cervical carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2005, 97(1):96-103
- [7] Kim YB, Kim GE, Pyo HR, et al. Differential cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004, 60(3):822-829
- [8] Ferrandina G, Ranelli F O, Legge F, et al. Prognostic role of the ratio between cyclooxygenase-2 in tumor and stroma compartments in cervical cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9):3117-3123